

IMPLEMENTAZIONE DI METODI ANALITICI PER LA RICERCA DI PALITOSSINE NELLA CATENA TROFICA

Responsabile Scientifico: *Roberta Orletti*

Orletti R.¹ (r.orletti@izsum.it), Ceredi A.², De Grandis G.³, Graziosi T.¹, Mengarelli C.³, Pigozzi F.³, Principi F.³, Riccardi E.², Bacchiocchi S.¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria-Marche Sezione di Ancona Via Cupa di Posatora, 3 60131 Ancona Italy

² Fondazione Centro Ricerche Marine Viale Vespucci, 2 47042 Cesenatico Italy

³ Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale Marche (ARPAM) Via Caduti del Lavoro, 40 60131 Ancona Italy

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni sono state segnalate fioriture di *Osteopsis ovata* in molte aree costiere italiane, tra cui, nelle Marche, quella prospiciente il Monte Conero (Fig. 1). Diverse specie appartenenti al genere *Osteopsis* sono in grado di produrre analoghi delle palitossine (PITXs), che, accumulandosi lungo la catena alimentare, rappresentano un potenziale rischio per la salute umana (1). Ogni estate, dal 2006, cozze selvatiche raccolte lungo la costa del Monte Conero sono risultate positive al biotest sui topi per la determinazione di tossine lipofile polari (MBA Step2), con una morte insolitamente molto rapida degli animali (2), contestualmente alla presenza di *O. ovata* nell'acqua. Durante tali episodi non sono comunque stati segnalati casi di intossicazione umana, legati al consumo di mitili provenienti da questa zona. Attualmente in Europa non esistono né limiti di legge né metodi analitici ufficiali per la ricerca di PITXs nei prodotti ittici. In questa ricerca sono stati testati e confrontati tre differenti metodi di analisi per la rilevazione delle PITXs nei molluschi: un saggio biologico specifico (MBA PITXs), un saggio di neutralizzazione dell'emolisi (HNA) e un metodo in LC-MS/MS.



Fig 1. Riviera del Conero

MATERIALI E METODI

Nei periodi in cui l'Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente delle Marche (ARPAM) ha segnalato la presenza di *O. ovata* nell'acqua di mare e nelle macroalghe prelevate lungo la Riviera del Conero, tutti i campioni di mitili raccolti nella stessa zona, risultati positivi al MBA Step 2, e alcuni controlli negativi, sono stati sottoposti al MBA PITXs (Fig. 2) (1, 3). 18 di loro sono stati analizzati con il HNA, test semiquantitativo basato sulla attività emolitica delle PITXs su eritrociti ovini, caratteristicamente inibita dall'ouabaina (Fig. 3) (4, 5). Infine, 12 campioni sono stati testati in LC-MS/MS, monitorando le transizioni più intense (m/z 1314> 327 per la palitossina putativa e m/z 1298> 327 per l'ovatossina-a) (Fig. 4) (6,7), per un totale di 63 campioni esaminati.

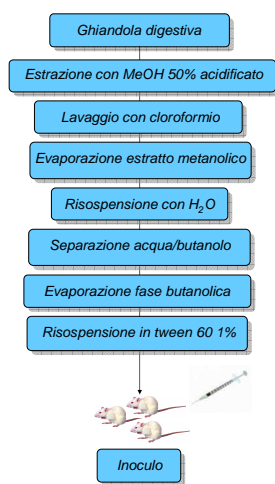


Fig 2. Biosaggio specifico (MBA PITXs)

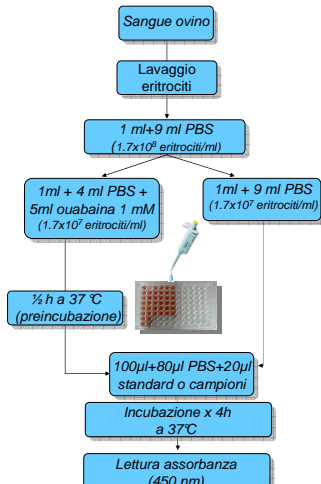


Fig 3. Saggio emolitico (HNA)

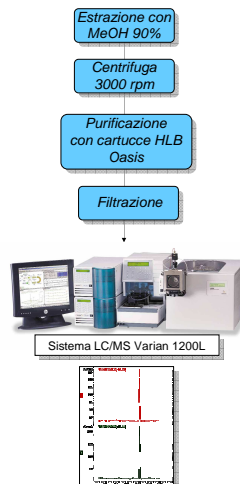


Fig 4. Metodo in LC-MS/MS

n°	Data prelievo	Sito prelievo	DSP Step 2	MBA PITXs		HNA µg/Kg p.e.**	LC-MS/MS µg/Kg p.e.***	
				1 ml/topo*	0.5 ml/topo*		OVTX-a	pPLTX
1	13-10-06	An nord	+	20'	33'	31	13	<LOD
2	13-10-06	An sud	+	38'	39'	8	<LOD	<LOD
3	13-10-06	Sir Nord	+	34'	42'	NA	30	14
4	13-10-06	Sir Sud	+	15'	27'	NA	<LOD	<LOD
5	06-11-06	An Nord	-	NA	NA	NA	<LOD	<LOD
6	06-11-06	An sud	+	NA	NA	<LOQ	<LOD	<LOD
7	06-11-06	Sir Nord	+	410'	vivo	NA	<LOD	<LOD
8	06-11-06	Sir Sud	+	NA	NA	NA	<LOD	<LOD
9	27-08-07	An nord	+	NA	NA	<LOD	13	<LOD
10	27-08-07	An sud	+	NA	NA	NA	<LOQ	<LOD
11	24-08-09	An Nord	+	40'	60'	17	<LOD	<LOD
12	24-08-09	Sir Nord	+	45'	60'	70	71	<LOD
13	24-08-09	Sir Sud	+	45'	60'	20	<LOQ	<LOD
14	01-09-09	An Nord	+	50'	100'	240	NA	NA
15	01-09-09	An Sud	-	vivo	vivo	<LOD	NA	NA
16	01-09-09	Sir Nord	+	70'	200'	100	NA	NA
17	21-09-09	An sud	+	NA	NA	200	NA	NA
18	21-09-09	An Nord	+	15'	20'	160	NA	NA
19	21-09-09	Sir Sud	+	10'	20'	320	NA	NA
20	06-10-09	An Nord	+	NA	NA	240	NA	NA
21	06-10-09	An Sud	+	NA	NA	160	NA	NA
22	06-10-09	Sir Nord	+	10'	20'	300	NA	NA
23	06-10-09	Sir Sud	+	NA	NA	200	NA	NA

Tab. 1. Risultati relativi a MBA Step 2, MBA PITXs, HNA e LC-MS/MS. In blu i risultati positivi. An=Ancona Sir=Sirolo. NA=Non analizzato *Tempo di morte (min). ** LOD=2 µg/Kg p.e. LOQ=6 µg/Kg p.e. *** LOD=17 µg/Kg p.e. LOQ=50 µg/Kg p.e.

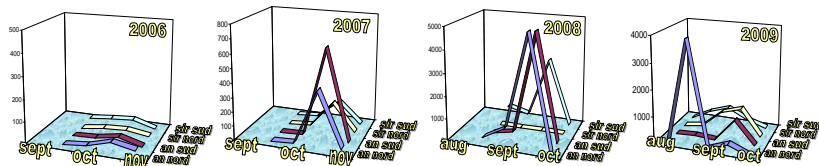


Fig 5. Concentrazioni di *O. ovata* lungo la costa del Monte Conero negli anni 2006-2009 (cell/L 1000x)

RISULTATI E DISCUSSIONE

La Fig. 5 mostra le concentrazioni di *O. ovata* riscontrate nell'area di studio negli anni 2006-2009. I risultati più significativi ai fini della valutazione dei metodi di prova sono riportati in Tab. 1. Il MBA PITXs ha mostrato una buona correlazione con il MBA Step2 in presenza di PITXs, risultando comunque maggiormente specifico, anche se caratterizzato da una importante perdita di analita nelle fasi preparative. L'HNA ha mostrato una buona correlazione con entrambi i saggi biotossicologici, la migliore sensibilità tra i vari metodi esaminati e minore suscettibilità alle interferenze da parte di altri composti tossici rispetto ai mouse-test. La LC-MS/MS ha permesso di individuare la presenza nei campioni di 2 isomeri della palitossina: l'Ovatossina-a (OVTX-a) e una Palitossina putativa (pPLTX). Esso ha inoltre consentito di spiegare molte delle discordanze riscontrate tra i 2 saggi biotossicologici, confermando l'interferenza delle yessotossine, specialmente nel caso dell'MBA Step2. Il saggio strumentale ha evidenziato una discreta correlazione con il MBA PITXs, mentre con l'HNA la concordanza è sicuramente risultata inferiore. Ciò però potrebbe trovare spiegazione nella differente sensibilità dei 2 metodi (Fig. 6). Il metodo strumentale è sicuramente il più adatto per la determinazione delle PITXs, ma necessita di un importante investimento economico da parte dei laboratori. Inoltre non esistono né metodi in LC-MS/MS validati, né materiali di riferimento certificati. Una combinazione di test diversi potrebbe quindi risultare utile nel monitoraggio dei campioni, soprattutto se caratterizzati da un profilo tossico complesso.

BIBLIOGRAFIA

- 1-Taniyama S, Arakawa O., Terada M., Nishio S., Takatani T., Mahmud Y., Noguchi T., 2003. *Osteopsis* sp., a possible origin of palytoxin (PTX) in parrotfish *Scarus ovrifrons*. *Toxicol* 42 (1), 29-33
- 2-Bacchiocchi S., Graziosi T., Moroni M., De Grandis G., Mengarelli C., Orletti R., 2007. Presence of *Osteopsis* and contamination by palytoxin on mussels of the Riviera del Conero (Ancona, Marche, Italy). *Atti Simposio Internazionale sulle biotossine marine. Trieste, 27-29 Maggio 2007.*
- 3-Lenoir S., Ten-Hage L., Turquet J., Quod J.P., Bernard C., Hennion M.C., 2004. First evidence of palytoxin analogues from an *Osteopsis mascareneensis* (*Dinophyceae*) benthic bloom in Southwestern Indian Ocean. *Journal of Phycology* 40 (6), 1042-1051.
- 4-Bignami GS, 1993. A rapid and sensitive hemolysis neutralization assay for palytoxins. *Toxicol* 31 (6), 817-820.
- 5-Haberermann E., Chhatwal GS, 1982. Ouabain inhibits the increase due to palytoxin of cation permeability of erythrocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's A. of Pharm* 319 101-107.
- 6-Ciminiello P, Dell'Aversano C, Fattorusso E, Forino M, Magno GS, Tartaglione L, Grillo C, Melchiorre N, 2006. The Genoa 2005 outbreak. Determination of putative palytoxin in Mediterranean *Osteopsis ovata* by a new liquid chromatography tandem mass spectrometry method. *Analytical Chemistry* 78 (17), 6153-6159.
- 7- Ciminiello P, Dell'Aversano C, Fattorusso E, Forino M, Tartaglione L, Grillo C, Melchiorre N, 2008. Putative palytoxin and its new analogue, ovatoxin-a, in *Osteopsis ovata* collected along the Ligurian coasts during the 2006 toxic outbreak. *Journal of American Society for Mass Spectrometry* 19 (1), 111-120.

Progetto di Ricerca Corrente realizzato con i fondi del Ministero della Salute

Stampato a cura dell'Unità Operativa di Supporto Biblioteca, Informazione, Editoria (2010).

Quest'opera è stata rilasciata sotto la licenza Creative Commons Attribution-Non commerciale-Non opere derivate 2.5 Italia.

Per leggere una copia della licenza visita il sito web <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/it/> o spedisci una lettera a Creative Commons, 94105, USA.

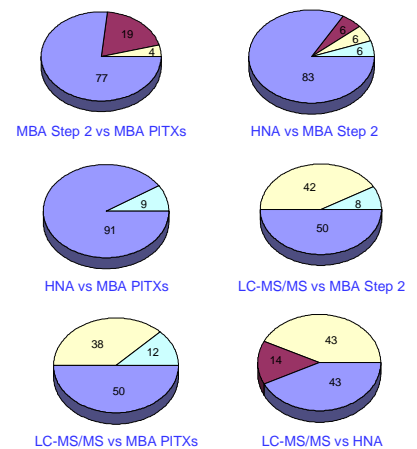


Fig 6. Percentuale di correlazione tra i metodi testati: viola= +/+, rosso= +/-, giallo= -/+, celeste= -/-.